

Zum Nachweis von
alpha-1-Antitrypsin-Proteasen-Komplexen
in Serum und Geweben

von
Klaus-Eberhard Baader
Gailenbach

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der HNO-Klinik der Universität München

(Direktor: Prof.Dr.H.H. Naumann)

Zum Nachweis von alpha-1-Antitrypsin-Pro-
teasen-Komplexen in Serum und Geweben

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu
München
vorgelegt

von
Klaus-Eberhard Baader
Gailenbach

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.10.1975



Meiner lieben Mutter

im Gedenken an meinen so früh verstorbenen Vater

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	7
B. Theoretischer Teil	9
Literaturübersicht	9
Molekulargewicht, Aminosäurezusammen- setzung und Struktur von alpha-1-Anti- trypsin	12
Vorkommen, Hemmspektrum und Verände- rungen des alpha-1-Antitrypsin-Spiegels	13
C. Ergebnisse	15
Untersuchungen mit steigenden Mengen von Trypsin	16
Untersuchungen mit Enzyn.Harz	17
Versuche zur Verdeutlichung der Kom- plexgipfel	21
Gewebsuntersuchungen	22
D. Diskussion	24
Bedeutung des alpha-1-Antitrypsins	24
Bedeutung des alpha-1-Antitrypsin- Proteasen-Komplexes	25
E. Material und Methoden	30
Material	30
Methoden	32
F. Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	38
Anhang: Abbildungen	42
Danksagung	47
Lebenslauf	49

A. Einleitung

Die Steuerung des Stoffwechsels lebender Zellen erfolgt durch Enzyme. Diese Katalysatoren gehören chemisch zu den Proteinen. Eine große Zahl von Enzymen konnte bisher in reiner, zum Teil kristallisierter Form dargestellt werden, bei vielen ist die Aminosäuresequenz bekannt.

Für die katalytische Wirksamkeit der Enzyme ist ihr "aktives Zentrum" verantwortlich, das aus bestimmten Teilen der Polypeptidkette durch besondere Faltung entsteht und spezifisch mit nur einem oder wenigen Substraten reagiert und in vielen Fällen auch die Wirkungsspezifität ausmacht.

Der großen Gruppe der Enzyme steht die physiologisch wichtige Gruppe der natürlichen Enzym-Inhibitoren gegenüber. So wurden auch zahlreiche proteinasenhemmende Substanzen in tierischen und pflanzlichen Geweben und Sekreten entdeckt, beginnend 1929, als BAUER, KRAUT, FREY und WERLE (1) einen Hemmstoff für Kallikrein⁺ aus Rinderge-
webe beschrieben.

⁺Enzym aus dem extrainsulären Pankreasteil mit leicht hyperglykämischer und hypotensiver Wirkung durch periphere Gefäßerweiterung (damit auch Förderung der Kallusbildung, Name); vaso-regulative Wirkung durch Kininbildung aus zirkulierenden alpha-2-Globulinen durch Abspaltung verschiedener Aminosäuren.

B. Theoretischer Teil

Literaturübersicht

Die ersten Beobachtungen über antitryptische Reaktionen stammen von FERMI und FERNOSSI, 1894(2). 1897 berichten CAMUS und GLEY (3) über natürlich vorkommende trypsinhemmende Aktivität im Blutserum.

Die ersten Aufzeichnungen über die Art des Stoffes finden sich bei LANDSTEINER im Jahre 1900 (4), der ihn nach Salzfraktionierung der Albuminfraktion zurechnete. Nachfolgend versuchten viele Autoren die Proteaseninhibitoren in chemische Gruppen einzuordnen. DELEZENNE und POZERSKY (5), SCHWARTZ (6), BAUER (7), JOBLING (8) hielten die antitryptischen Faktoren für Fette, weil sie durch Chloroform zerstört wurden. Andere widersprachen dem (9-11), HEDIN (12), WIENS (13), MEYER (14) und EISNER (15) endlich meinten, diese "Antifermente" hätten Antikörper-Charakter.

Die chemische Darstellung der Inhibitoren wurde erst 1938 von SCHMITZ (16) fortgesetzt, doch der von ihm gefundene Inhibitor war teilweise denaturiert und konnte nicht genau charakterisiert werden.

Bei den tierischen Proteaseninhibitoren unterscheidet man Gewebsinhibitoren, sekretorische und humorale Inhibitoren.

Einer der wichtigsten humoralen, d.h. den Körperflüssigkeiten zugeordneten Inhibitoren von eiweißspaltenden Enzymen ist das sogenannte alpha-1-Antitrypsin. Dieser Hemmstoff wurde bisher intensiv bearbeitet. Über die physiologische Funktion liegen detaillierte Ergebnisse vor, auf die im Folgenden noch eingegangen wird.

In der vorliegenden Arbeit, die ich im Rahmen der Inhibitorforschungen von Herrn Dozent Hochstraßer übernahm, wird davon ausgegangen, daß im Blut kreisende Verbindungen von proteolytischen Enzymen und alpha-1-Antitrypsin diagnostische Aussagen zulassen, und es wird der Versuch unternommen ein Verfahren zu entwickeln, das die relative Veränderung des Blutspiegels dieser Verbindungen von proteolytischen Enzymen und alpha-1-Antitrypsin erkennen läßt.

1939 konnten SMITH und LINDSLEY (17) mit der neu eingeführten Elektrophorese LANDSTEINERS Angaben über die antitryptische Aktivität in der Albumin-Zone bestätigen. JACOBSSON (18,19) konnte 1953 2 Inhibitoren elektrophoretisch trennen und 90% der trypsinhemmenden Wirkung in der alpha-1-Globulin-Zone und 10% in der alpha-2-Globulin-Zone lokalisieren. SCHULTZE und Mitarbeiter (20) gelang es dann 1955 den alpha-1-Trypsin-Inhibitor zu isolieren (was auch 1959 BUNDY und MEHL (21) erreichten) und als alpha-1-3,55-Glykoprotein zu charakterisieren, aber die Autoren erkannten seine Inhibitor-Funktion noch nicht.

Erst 1962 wurde die Funktion des Hauptinhibitors des Plasmas für Trypsin bei Kontrolluntersuchungen mit Fibrinagar-Elektrophorese herausgefunden (22), und der Inhibitor alpha-1-Antitrypsin genannt.

Inzwischen kennt man noch 5 weitere humorale Proteaseninhibitoren, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit oder nach ihrer wichtigsten, zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung bekannten Funktion benannt wurden; das sind alpha-1-Anti-Chymotrypsin, Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor, Antithrombin III, C₁-Esterase-Inactivator und alpha-2-Makroglobulin (23).

Tabelle der Wirkungsspezifität nach (23)

Inhibitor	Enzyme							
	Trypsin	Chymo- trypsin	Plasmin	Plasma Kalli- krein	Pankreas Kalli- krein	Thrombin	C ₁ -Este- rase	Elastase
alpha-1- Antitrypsin	+	+	+	?	+	-	-	+
alpha-1- Antichymo- trypsin	-	+	-	?	-	-	-	-
Inter-alpha- Trypsin- Inhibitor	+	schwach	-	?	-	-	-	-
Antithrom- bin III	+	-	schwach	-	-	+	-	-
C ₁ -Esterase- Inaktivator	schwach	schwach	+	+	-	-	+	-
alpha-2-Makro- globulin	+	+	+	+	-	+	-	+

Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung
und Struktur von alpha-1-Antitrypsin

Das Molekulargewicht von alpha-1-Antitrypsin wird zumeist mit 54000 angegeben (24-29), doch schwanken die Zahlen in der Literatur etwas (annähernd 60000 (30), etwa 47000 (31)).

Der in der Leber synthetisierte Inhibitor besteht zu 86% aus Aminosäuren, 12,2% sind Kohlehydrate; SCHWICK und Mitarbeiter (32) fanden kein Cystein oder Cystin im alpha-1-Antitrypsin und erklärten die Säureanfälligkeit des Inhibitors alpha-1-Antitrypsin wird bei einem pH unter 5 irreversibel geschädigt und durch die fehlenden Schwefelbrücken. Dem wird allerdings heute widersprochen.

Das aktive Zentrum von alpha-1-Antitrypsin wird von einem Lysinrest gebildet (23).

Als Sedimentationskonstante wurde 3,5 S, als elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit $- 5,42 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{sec.}}$ festgestellt (24).

Vorkommen, Hemmspektrum und Veränderungen des alpha-1-Antitrypsin-Spiegels

In 100 ml Plasma finden sich durchschnittlich 290 mg alpha-1-Antitrypsin. Schwankungen von 200-400 mg pro 100 ml Plasma gelten als normal (33). 1 ml Serum kann etwa 1,2 mg Trypsin inaktivieren (34). Der Inhibitor kann außer im Blut auch in Muttermilch, Colostrum, Urin (35), Sputum (36), Nasen- und Bronchialsekret (37,38), Lungensekret und Liquor gefunden werden.

Er vermag Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Elastase, bestimmte Collagenasen, acrosomale und leukozytäre Proteasen zu hemmen (23,25,39-50), die zu den stärksten Entzündungsmediatoren zählen (51,52). Diese Tatsache erklärt, daß bei erblichem alpha-1-Antitrypsinmangel nicht oder nur unzureichend inaktivierte, in Geweben und Gefäßen freigesetzte Proteasen zu pathologischen Erscheinungen führen können.

Häufig ist z.B. hereditärer Mangel an Serum-alpha-1-Antitrypsin mit Lungenemphysemen korreliert (35,53-62). Zusammenhänge zwischen Proteaseninhibitor-Mangel und Bronchiektasien, chronischer Bronchitis, Pancreatiden und anderen pathologischen Zuständen wurden erörtert (63,64).

Andererseits müssen Vorgänge im Organismus, die den Proteasenspiegel beeinflussen, wie z.B. Entzündungen oder Gewebs- und Zellzerfall, der über den normalen Abbau hinausgeht, zu Rückwirkungen auf die Menge des im Blut kreisenden alpha-1-Antitrypsins führen.

So ist bei akuten Erkrankungen, Entzündungen (65), metastatisierenden Karzinomata (23), Schwangerschaften (66), nach Herzinfarkten, Magenblutungen, Hepatitiden, Leberzirrhosen, Cholezystopathien, Bronchopneumonien, Silikosen, Silikotuberkulosen (67,68) der alpha-1-Antitrypsin-Spiegel im Sinne einer Gegenregulation erhöht; bei Nephrosen und Schilddrüsenerkrankungen (69,70) erniedrigt. Man bezeichnet das alpha-1-Antitrypsin als "acute phase" Protein.

C. Ergebnisse

Bei der einfachen Immunelektrophorese von Serum, dessen Plasminogen durch Streptokinase zu Plasmin aktiviert wurde, konnte bei Verwendung von Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum häufig eine zweite Präzipitationslinie gefunden werden, die in Richtung zur Kathode verschoben ist (23,38).

Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese solcher Seren oder von Bronchial-Sekret manifestiert sich neben dem Präzipitationsgipfel des freien, ungebundenen alpha-1-Antitrypsins ebenfalls kathodenwärts ein zweiter Gipfel (53,71,72). Ob es sich bei diesem zweiten Gipfel wirklich um Komplexe mit Proteasen handelt oder aber um genetische Varianten des freien alpha-1-Antitrypsins, die durch andere Molekülform oder Ladung langsamer im elektrischen Feld wandern (73), war bislang ungewiß. FAGERHOLM konnte mittels Stärkegelelektrophorese in saurem Milieu verschiedene, nach den Mendel'schen Gesetzen vererbte Varianten trennen (87,88).

Die Interpretation dieses zweiten, immer sehr kleinen Präzipitationsgipfels (Abb.1.2) als

Komplex mit Proteasen gründet sich bisher darauf, daß dieser Gipfel an der gleichen Stelle des Pherogramms liegt wie die Präzipitationslinie, die nach Mischen von Serum mit Trypsin auftritt.

Untersuchungen mit steigenden Mengen von Trypsin

Gibt man zu Serum steigende Mengen Trypsin, so zeigt sich auf dem Pherogramm nach zweidimensionaler Immunelektrophorese ein zweiter, näher zur Kathode liegender Gipfel, dessen Fläche mit zunehmender Trypsinzugabe größer wird. Ein eventuell schon vorhandener zweiter Gipfel, den wir als Ausdruck natürlich vorkommender, gesteigerter Menge komplexierten alpha-1-Antitrypsins interpretieren, wächst ebenfalls nach Mischen von Serum und Trypsinlösung. Die Fläche unter der Präzipitationslinie für das freie alpha-1-Antitrypsin nimmt dabei laufend ab und verschwindet bei einigen Pherogrammen fast vollständig. Bei der photometrischen Bestimmung der Hemmkapazität des Serums gegen Trypsin läßt sich gleichzeitig feststellen, daß diese mit fortschreitender Trypsinzugabe immer geringer wird, bis sie fast erlischt.⁺

⁺An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Kollegen F. Pecher bedanken, der zur gleichen Zeit im Rahmen seiner Doktorarbeit die Seren photometrisch untersuchte, und dem ich diese Ergebnisse verdanke.

Daraus folgt, daß der zweite Gipfel durch den Enzym-Inhibitor-Komplex, also alpha-1-Antitrypsin verbunden mit Trypsin, hervorgerufen wird. Das alpha-1-Antitrypsin dieses Gipfels läßt sich in der Elektrophorese immunologisch nachweisen; die für die Immunreaktion wichtigen Molekülteile sind durch das Trypsin nicht blockiert. Durch die eingegangene Bindung ist das alpha-1-Antitrypsin inhibitorisch nicht mehr aktiv; Bindungsmöglichkeiten für weiteres Trypsin bestehen nicht. (Abb.3-5)

Dies könnte auch bewiesen werden, wenn es gelingt, aus einem Serum mit alpha-1-Antitrypsin-Doppelgipfel freies aktives alpha-1-Antitrypsin zu binden und zu entfernen. Bleibt der zweite langsamere wandernde Gipfel unverändert, während der andere Gipfel des freien alpha-1-Antitrypsins stark abnimmt oder verschwindet, so kann es sich beim erstgenannten, zur Kathode hin gelegenen Gipfel nur um inaktives, bereits komplexiertes alpha-1-Antitrypsin handeln. (Abb.6-8)

Untersuchungen mit Enzym-Harz

Zur Entfernung von freiem alpha-1-Antitrypsin aus dem Serum wurde versucht, den Inhibitor an Trypsin- oder Chymotrypsin-Harz zu binden. Dies gelang mit käuflichen lyophilisierten Harzen nicht.

Bei der Herstellung von Enzymharzen wird das Enzym über freie NH_2 -Gruppen und ein Zwischenglied an die Harzmatrix gebunden. Das Enzym wird dabei in statistischer Streuung in verschiedener räumlicher Anordnung und verschiedener Freilegung des aktiven Zentrums gebunden. In einem solchen Harz kommen Trypsinmoleküle mit unterschiedlicher Reaktivität vor. Von solchen Harzen werden niedermolekulare Substrate gut umgesetzt, und auch niedermolekulare Inhibitoren bei guter Reversibilität gebunden (74,75). Die Reaktionen werden hier offensichtlich nur unbedeutend behindert.

Das Molekulargewicht von alpha-1-Antitrypsin beträgt jedoch etwa 54000. Die reaktiven Zentren dieses Inhibitors für Trypsin oder Chymotrypsin sind wahrscheinlich räumlich so gelegen, daß sie nur mit bestimmten leicht zugänglichen aktiven Zentren des am Harz fixierten Enzyms reagieren können.

Nun gelang es im Arbeitskreis HOCHSTRASSER unlösliches Trypsin- bzw. Chymotrypsinharz auf CM-Cellulosebasis herzustellen, das in gewissem Ausmaß Enzym enthält, das mit dem freien alpha-1-Antitrypsin des Serums eine Bindung eingeht.

Bei 15-minütiger Inkubation von Serum mit geringen Harzmengen im sogenannten "batch"-Verfahren und anschließender Zentrifugierung verschwindet die Hemmwirkung im filtrierten Überstand bei photometrischer Untersuchung zu etwa 90%. Die Präzipitationsgipfel nach Immunelektrophorese für das freie alpha-1-Antitrypsin von harzbehandelten Seren sind deutlich kleiner, als die von gleichen unbehandelten Seren.

Auch bei Seren mit natürlichen Doppelgipfeln bewährt sich die Methode. Das freie alpha-1-Antitrypsin wird selektiv entfernt, der Proteasen-Inhibitor-Komplex bleibt im Rahmen der Beurteilungsmöglichkeit bei dieser Methodik unverändert. (Abb.9,10)

Der Verdacht, daß es sich bei diesem Ergebnis um proteolytischen Abbau handelt und nicht um selektive Bindung des Inhibitors an das Harz, läßt sich dadurch entkräften, daß andere Eiweißkörper des Serums nicht verändert werden, wie sich anhand von zweidimensionalen Simultanelektrophoresen von behandeltem und unbehandeltem Serum zeigen läßt. (Abb.11,12)

Beim Vergleich der beiden Pherogramme sieht man, daß beim harzbehandelten Serum der Gipfel für alpha-1-Antitrypsin stark erniedrigt ist, während die Präzipitationsgipfel der übrigen Serumproteine sich bei beiden Abbildungen entsprechen.

Die hohe Selektivität des Harzes bewährt sich auch, wenn es gilt, freies alpha-1-Antitrypsin aus komplexhaltigen Seren zu entfernen. Hierzu wird ein künstlicher Komplex durch Zugabe von Trypsinlösung zu Serum hergestellt, ein Teil der komplexhaltigen Mischung mit Harz behandelt, und dann mit behandeltem und unbehandeltem Serum unter gleichen Bedingungen ein Pherogramm mit monovalentem Anti-alpha-1-Antitrypsinserum hergestellt. (Abb.13,14)

Die Abbildungen zeigen, daß die Gipfelflächen der künstlichen Komplexe vor und nach der Harzbehandlung praktisch gleich bleiben, während die Fläche unter der Präzipitationslinie für das freie alpha-1-Antitrypsin stark abnimmt.

Vollständig entfernen läßt sich das freie alpha-1-Antitrypsin nur in ganz wenigen Fällen. Bei großem Überschuß von Trypsinharz tritt Proteolyse ein; dann verschwindet auch die Komplexverbindung. Abbauprodukte führen dann bei der Radialimmundiffusion zu Doppelringen (76). (Abb.15)

Versuche zur Verdeutlichung der Komplezgipfel

Nun wurde der Versuch unternommen, den Gipfel für den Enzym-Inhibitor-Komplex bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese deutlicher darzustellen.

Die Harzbehandlung ermöglicht ein Kleinhalten des Gipfels von freiem alpha-1-Antitrypsin und verhindert damit eine Überlagerung beider Präzipitationsgipfel. Es kann bei Vergrößerung der Startlöcher eine vielfach größere Menge an Serum auf die Elektrophoreseplatten aufgebracht werden. Dadurch natürliche Komplexe als deutliche, ohne große Fehler auszumessende Gipfel Flächen darzustellen, oder am alpha-1-Antitrypsin-Gipfel anhängende Komplex-Präzipitations-"Schwänzchen" auf deutliche Gipfel Fläche vergrößern zu können läßt sich auch unter vielfach veränderten Versuchsbedingungen nicht realisieren. Es gelingt auch nicht in normalen Seren Doppelgipfel durch diese Methode zu finden.

Ebenso mißlingen Versuche Seren mit Doppelgipfeln mittels Filtrierspitzen einzuengen und danach die Komplezgipfel größer darzustellen. Zwar können die Flächen unter den Präzipitationslinien vergrößert werden, doch nie in so starkem Ausmaß wie es nötig wäre um die Gipfel-

flächen ohne große Meßfehler auszumessen. Gerade das aber wäre wünschenswert um die im Blut kreisende Menge an Enzym-Inhibitor-Komplex zu bestimmen und objektivierbare Daten zur Diagnosefindung zu erhalten. (Abb.16,17)

Die Zahl der natürlich vorkommenden und bei der angewandten Methodik herauszufindenden Doppelpipfel ist gering (9 bei 100 untersuchten Seren), am alpha-1-Antitrypsin-Gipfel anhängende flache Präzipitationslinien der Komplexverbindung können dagegen in etwa einem Drittel der Fälle ausgemacht werden.

Gewebsuntersuchungen

Um überhaupt einen Hinweis zu erhalten, ob bei Gewebszerfall mit dem Auftreten von komplexiertem alpha-1-Antitrypsin gerechnet werden muß, wurden verschiedene Gewebe mit Serum homogenisiert und mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese-Methodik auf alpha-1-Antitrypsin-Komplex untersucht.

Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 18-22; sie differieren gemäß der unterschiedlichen Zellzahl, des Blutgehaltes und des Proteasen- und Inhibitorgehaltes der Gewebe.

Von den untersuchten Geweben ergibt nur Milzgewebe ein deutliches Pherogramm. Dies besagt, daß in diesem Gewebe besonders viel alpha-1-Antitrypsin und damit reagierende Proteasen gefunden werden. Wir interpretieren dieses Ergebnis als Ausdruck größerer Mengen bei der Blutmauserung hier vorkommender leukozytärer Proteasen, die eine verstärkte Anwesenheit von alpha-1-Antitrypsin bedingen. Im Gegensatz dazu werden bei den anderen Geweben wahrscheinlich hauptsächlich saure katheptische Enzyme frei, die von alpha-2-Makroglobulin gehemmt werden und die alpha-1-Antitrypsin wegen ihrer sauren Reaktion schädigen.

D. Diskussion

Bedeutung des alpha-1-Antitrypsins

Alpha-1-Antitrypsin spielt im komplexen Geschehen des Kreislaufs eine bedeutende Rolle. Die dauernde physiologische Aktivierung von Plasmin und anderen Proteasen kann nur in Gegenwart von entsprechenden Inhibitoren in einem physiologischen Gleichgewicht gehalten werden.

Ferner darf nicht außer acht gelassen werden, daß nicht gehemmte leukozytäre Proteasen Basalmembranen schädigen können (77,78). Bei Zellzerfall freigesetzte lysosomale Proteasen könnten ohne ausreichenden Inhibitorschutz das Kalikrein-Kinin-System aktivieren und schon bei normalerweise unbedeutenden Krankheitsfällen einen Schock auslösen. OHLSSON demonstrierte an Hunden, daß durch Infusion von Trypsin oder Chymotrypsin bis zur Erschöpfung des inhibierenden Systems tödliche Schockzustände erzeugt werden können.

Aber auch bei normalem Inhibitorgehalt im Blut wird der alpha-1-Antitrypsinspiegel bei fast allen Krankheiten beeinflußt und durch vermehrte Bindung an Enzyme oder verminderte Bildung oder

Ausschwemmung ins Blut herabgesetzt bzw. durch überschießende Produktion oder verringerten Proteasenanfall erhöht.

Bedeutung des Komplexes

Allein hieraus ergibt sich, daß die Höhe des alpha-1-Antitrypsinspiegels nur ein unbedeutendes Indiz bei der Diagnosefindung bleiben muß, wenn es nicht gleichzeitig möglich ist anzugeben, ob zum Beispiel die Verringerung des alpha-1-Antitrypsins im Serum durch vermehrte Bindung an proteolytische Enzyme oder durch verminderte Produktion hervorgerufen wurde. Diese Frage läßt sich durch die zweidimensionale Immunelektrophorese, mit gleichzeitiger Darstellung des freien und des gebundenen alpha-1-Antitrypsins klären.

Ebenso könnte die Darstellung des alpha-1-Antitrypsin-Proteasen-Komplexes in der Zukunft diagnostisch von großer Bedeutung sein, wenn es möglich wäre herauszufinden, wo diese Proteasen freigesetzt wurden.

Bevor die Ergebnisse der Immunelektrophorese-Untersuchungen zu Aussagen herangezogen werden konnten, mußte bewiesen sein, daß - bei der angewandten Methode - es sich beim zweiten, zur Kathode hin gelegenen Präzipitationsgipfel,

wirklich um einen Komplex von Proteasen mit dem Inhibitor handelt. Immerhin wäre denkbar, daß dieser Gipfel auf eine genetische Variante des alpha-1-Antitrypsins zurückzuführen ist, die entsprechend einer anderen Molekülform, Molekülgröße und Ladung langsamer bei der Elektrophorese wandert.

Nun zeigen die Untersuchungen, daß der zweite Gipfel das gleiche elektrophoretische Verhalten besitzt wie ein künstlicher, durch Trypsinzugabe geschaffener Enzym-Inhibitor-Komplex.

Durch die Versuche mit künstlichen Komplexen und der Simultanelektrophorese nach Harzbehandlung konnte auch die Möglichkeit ausgeschlossen werden, es könnte sich bei dem zweiten Gipfel um Abbauprodukte des alpha-1-Antitrypsins nach Proteolyse handeln.

Da die Substanz, die den zweiten kathodennäheren Gipfel hervorruft, nicht mit dem an die Harzmatrix gebundenen Trypsin oder Chymotrypsin reagiert, und dieser Gipfel nur kurzzeitig auftritt, erscheint die These der genetischen Variante sehr unwahrscheinlich. Diese Aussage stützt somit die Meinung anderer Autoren (OHLSSON, HEIM-

BURGER und Mitarbeiter, u.a.m.), die a priori diese Präzipitationslinie für den Ausdruck der Enzym-Inhibitor-Verbindung hielten.

Nun mußte überdacht werden, inwieweit das seltene Auftreten von Doppelgipfeln bei Serumuntersuchungen mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese - hier 9 Doppelgipfel bei 100 Seren - diagnostisch auswertbar ist.

Das Vorkommen von 14 am Gipfel des freien alpha-1-Antitrypsins anhängenden flachen Präzipitationslinien der Komplexverbindung bei 49 der als krank in Behandlung befindlichen Patienten, und von 12 solchen Präzipitationslinien bei 51 der nach sonstigen Blutwerten gesunden oder zur Kontrolle erschienenen Patienten wird als Ausdruck erhöhter Normalwerte interpretiert. Immerhin waren bei 65 Patienten weder Doppelgipfel noch andere Komplexzeichen festzustellen.

Es wurden vielerlei Versuche unternommen durch Vergrößerung der Serumauftragmenge, Einengen des Serums, Verringerung des Antiserumgehalts, Veränderung der Laufzeit durch die anliegende Spannung bestehende Komplexzeichen zu verdeutlichen und auch in anscheinend komplexfreien Seren Enzym-Inhibitor-Komplexe aufzufinden.

Diese Versuche führten zu keinem deutlich besseren Ergebnis.

Bei 3 Patienten mit Doppelgipfelserum konnte einen Tag später erneut Blut abgenommen und untersucht werden. In keinem der Fälle wurde wieder ein Komplexgipfel gefunden. In Verbindung mit dem oben Gesagten muß damit die Möglichkeit durch die zweidimensionale Immunelektrophorese aus dem alpha-1-Antitrypsin-Proteasen-Komplex Rückschlüsse auf pathologische Vorgänge im menschlichen Organismus ziehen zu können als nicht gegeben angesehen werden.

Zur Erklärung kann man Erkenntnisse, die OHLSSON 1971 aus Tierexperimenten gewonnen hat, auf den Menschen übertragen. OHLSSON hatte Hunden Trypsin und Chymotrypsin infundiert (71,79,80) oder künstlich Pancreatitis durch Schaffung einer geschlossenen Duodenalschleife ausgelöst (81). Dabei fand er, daß alpha-1-Antitrypsin-(Chymo-)Trypsin-Komplexe relativ schnell in solche mit alpha-2-Makroglobulinen (beim Hund 2) umgewandelt werden, weil Affinität von Trypsin und Chymotrypsin zu diesen Inhibitoren stärker ist als zu allen anderen Inhibitoren zusammen.

Auch scheint der Abbau der alpha-2-Makroglobulin-Proteasen-Komplexe in den RES-Zellen der

Leber (82) recht schnell vor sich zu gehen, denn OHLSSON fand die Verbindung zwar im pancreatico-duodenalen Venenblut und in der Lymphe, nicht dagegen im peripheren Venenblut.

Wenn diese Vorgänge beim Menschen vergleichbar ablaufen und die Komplexverbindung, die vom Organismus vielleicht nicht mehr als körpereigenes Eiweiß erkannt wird, schnell aus dem Blutstrom entfernt oder in die Interstitialräume geschafft wird, wäre zu folgern, daß Ergebnisse wie wir sie erwarteten, nur bei Versuchen mit aus internen Gefäßen oder nahe am Ausgangspunkt der Proteasen gewonnenen Blutproben vorstellbar sind. Sollten solche Untersuchungen als bedeutungsvoll erachtet werden, hoffen wir eine gute Vorarbeit geleistet zu haben.

Ferner ist zu bedenken, daß der Vorrat an verschiedenen Proteaseninhibitoren so groß zu sein scheint, daß übermäßiger Verbrauch von einem Inhibitor durch andere Enzymhemmer ausgeglichen werden kann, und somit das Inhibitorensystem physiologischerweise nie bis an die Grenzen belastet wird.

E. Material und Methoden

Material:

Substrate

Trypsin: EC 3.4.4.4.; Novo Industri, Kopenhagen, 23,5 AE/g, 4365 NF/mg; kristallisiert, lyophilisiert, vom Rind, behandelt mit N-Tosyl-L-phenylalanin-chlormethan, 50 mg in 5 ml 0,0025 n HCl gelöst; zur Verhinderung von Autolyse im Kühlschrank (ca. 4°C) aufbewahrt; Lösung 2 x wöchentlich erneuert.

N^a-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid (BAPNA):

Merck; 100 mg BAPNA in 100 ml aqua dest. unter Erwärmung gelöst.

Puffer

Triäthanolamin-hydrochlorid (TRA):

EGA-Chemie; 0,4 mol/l TRA-Puffer + 0,6 mol/l NaCl, pH = 7,8 als Mischpuffer

Barbituratpuffer für die Elektrophorese:

- a) 77 g Na-Barbiturat; 13,8 g Barbitursäure; 3,85 g Ca-lactat; 1 g Natriumazid; 5 l aqua dest.
pH = 8,0
- b) 80 g Veronalnatrium; 52,6 g Natriumazetat · 3 H₂O; 9 l aqua dest.
pH = 8,2

Elektrophoresematerial

Agarose von den Behringwerken, Marburg/Lahn
Antihumanserum vom Kaninchen, Behringwerke AG
Anti-alpha-1-Antitrypsinserum vom Kaninchen,
Behringwerke AG

Trypsinharz

Trypsin polymer gebunden an CM-Cellulose, hergestellt aus CM-Cellulosehydrazid (E. Merck) und Trypsin nach einer Vorschrift von E. Merck, Darmstadt.

Zur Herstellung wird zunächst CM-Cellulosehydrazid in das Azid übergeführt. Dazu werden 1 g CM-Cellulosehydrazid in 100 ml 0,5 mol/l HCl bei 2°C suspendiert und langsam 5 ml 50 g/l NaNO_2 -Lösung zugegeben. Nach 20 min. Rühren wird das CM-Cellulose-Azid abzentrifugiert und durch mehrmaliges Waschen mit kaltem Wasser nitritfrei gemacht (KJ-Stärkepapier). Das CM-Cellulose-Azid wird sofort in eine vorbereitete Lösung von 1 g Trypsin (oder Chymotrypsin) in 0,1 mol/l Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH = 8,5, enthaltend 0,01 mol/l CaCl_2 eingerührt und die Suspension im Ultraturrax homogenisiert. Nach 2 Stunden wird das CM-Cellulose-Enzym-Konjugat abzentrifugiert. Durch Bestimmung der Trypsinmenge im Überstand kann festgestellt werden, wieviel des eingesetzten Enzyms polymer gebunden wurde (dies bedeutet jedoch nicht, daß das gesamte gebundene Enzym auch enzymatisch aktiv ist). Nach Auswaschen von unspezifisch adsorbiertem Enzym mit 0,2 mol/l Triäthylamin-HCl-Puffer, pH = 8,5, enthaltend 0,5 mol/l NaCl durch scharfes Zentrifugieren wird das feuchte Harz für die Untersuchungen verwendet. Die Waschflüssigkeit darf keine Enzymaktivität mehr aufweisen. Bei der Gefrier-trocknung verliert die Enzymcellulose die Fähigkeit zur Bindung von alpha-1-Antitrypsin.

B-Propiolacton von Schuchardt zum Modifizieren von Serum durch Änderung der Elektronenverteilung

Apparate

Photometer nach Eppendorff, Hg-Filter
405 nm, Küvetten mit $d = 1$ cm
Elektrophorese-System Boskamp
MBI-Immuno-Electrophoresis-Tank, Medical
& Biological Instrumentation Ltd, Ashford,
Kent; bezogen über Labora, Karlheinz Bässler,
Frankfurt
Diapositivgläser 5×5 cm
Sartorius-Dialysierhülsen zum Einengen

Seren Das Blut wurde Patienten der Universitäts-Poliklinik München oder Probanden aus einer Vene der Armbeuge abgenommen, nach Kühlung zentrifugiert und dann untersucht. Längere Zeit tiefgekühlt gelagertes Serum erbrachte veränderte Ergebnisse, insbesondere verringerte sich die Komplexverbindung.

Methoden:

Enzymbestimmung

Definition der Enzymeinheit:

1 Enzymeinheit (U) setzt unter Standardbedingungen 1 μmol Substrat pro Minute um (83).

Definition der Inhibitoreinheit für Trypsin:

1 ImU (Inhibitor-milli-Einheit) ist die Inhibitormenge, die die hydrolytische Wirkung von 1 μg Trypsin aufhebt.

Hemmkapazität der Seren

Die Hemmwirkung der verwendeten Seren gegen Trypsin wurde anhand der Verminderung der Hydrolysegeschwindigkeit von N^a -Benzoyl-

arginin-4-nitroanilid durch Trypsin in Standardansätzen (84_ bestimmt; dabei wird die Geschwindigkeit der Freisetzung p-Nitroanilid am Photometer bei 405 nm gemessen, und zwar zuerst der Leerwert (ohne Serum) nach folgendem Ansatz: 0,2 ml Trypsinlösung, 1,8 ml TRA-Puffer, 1,0 ml BAPNA; dann wird die Serum-Trypsin-Hemmkapazität bestimmt; Ansatz: x ml Serum-Verdünnung, 0,2 ml Trypsinlösung, 1,8 - x ml TRA-Puffer, 1,0 ml BAPNA; Nun wird die Extinktionsänderung für die Serumverdünnung von der für den Leerwert abgezogen, die Differenz mit einem speziellen Korrekturfaktor (hier 0,33) und der Verdünnung des Serums multipliziert; das Ergebnis ist die Hemmkapazität des bestimmten Serums für Trypsin in mU/ml.

Herstellung von alpha-1-Antitrypsin-Trypsin-Komplexen

Serum wird mit 0,4 mol/l TRA-Puffer, pH = 7,8, im Verhältnis 1:1 vernuscht, Es wird die Hemmkapazität für Trypsin bestimmt (etwa 90% der Hemmwirkung im Serum geht von alpha-1-Antitrypsin aus). Bei bekanntem Inhibitorgehalt des Serums ist es dann möglich diejenige Trypsinmenge zu berechnen, die zur Überführung eines definierten alpha-1-Antitrypsin-Anteils in die Komplexverbindung notwendig ist. Nach Zugabe der berechneten Menge von Trypsin und Bestimmung der noch vorhandenen Hemmkapazität ist es möglich, die tatsächlich in den Komplex übergeführte Inhibitormenge zu berechnen.

Adsorption von alpha-1-Antitrypsin an Trypsin- oder Chymotrypsinharz

2 ml Serumverdünnung mit bekanntem Inhibitorgehalt wird mit etwa 100 mg aus dem Herstellungsansatz abzentrifugierten, feuchten Enzymharz vermischt und 15 min. bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Abzentrifugieren wird die verbleibende Resthemmkapazität des Überstands bestimmt. Eine gewisse Resthemmkapazität von etwa 10 - 20% des Ausgangswertes ist nicht zu entfernen; sie geht von den übrigen Serum-inhibitoren und von einer geringen Menge nicht adsorbierbaren alpha-1-Antitrypsins aus.

Bei diesem Vorgehen ist es möglich, diejenige minimale Harzmenge zu ermitteln, die zur Entfernung von alpha-1-Antitrypsin notwendig ist. Die Verwendung von überschüssigen Harzmengen ist nicht möglich, da sonst Proteolyse mit Abbau von freiem und komplexgebundenem alpha-1-Antitrypsin eintritt. Nach unseren Erfahrungen werden pro ml Serum 200-400 mg feuchtes Harz benötigt (es gelingt nicht Harz mit gleichbleibendem Enzymgehalt herzustellen).

Elektrophorese

Die Technik der zweidimensionalen Immunelektrophorese besteht darin, daß der herkömmlichen normalen elektrophoretischen Trennung in Agarose eine zweite elektrophoretische Trennung folgt, bei der im rechten Winkel zur ersten Laufrichtung das aufgetrennte Serum in einen mit Antiserum getränkten Agaroseweg gezwungen wird.

Dabei entsteht für jedes Protein eine Präzipitationskurve, wobei die darunter liegende Fläche direkt proportional der Antigenmenge und umgekehrt proportional der Antikörperkonzentration ist. Die zweidimensionale Immunelektrophorese von alpha-1-Antitrypsin und Komplexen wurde nach LAURELL bei pH = 8,0 durchgeführt (85,86). Bei diesem pH ist eine Auftrennung der genetisch bedingten Varianten (87,88) des alpha-1-Antitrypsins nicht zu beobachten.

Untersuchungen zur Selektivität der Harzbehandlung

2 ml verdünntes Humanserum wird mit Enzymharz bis zum Verschwinden von etwa 90% der Hemmwirkung behandelt. Nach Zentrifugieren und Filtrieren des Überstandes wird mit 8 μ l Propiolacton modifiziert (2 h/37°C). Nichtharzbehandeltes Serum wird ebenfalls modifiziert. Von beiden Proben wird eine zweidimensionale Simultanimmunelektrophorese gegen Antihumanserum durchgeführt nach STEPHAN und FRAHM (89).

Serum, dessen alpha-1-Antitrypsin durch Zugabe von Trypsin zu etwa 30% in Komplex übergeführt wurde, wird zum Teil wie oben beschrieben, mit Harz behandelt. Proben beider Teile werden einer zweidimensionalen Immunelektrophorese unterzogen.

Gewebeuntersuchungen

Das tiefgefrorene menschliche Gewebe wird zerkleinert, mit Humanserum im Verhältnis 600 mg Gewebe/ml Serum mit dem Ultraturrax homogenisiert und der Überstand nach Zentrifugieren der Immunelektrophorese unterzogen.

F. Zusammenfassung

- 1.) Einleitend wurde ein Überblick über grundlegende Charakteristika der Enzyme und Enzyminhibitoren gegeben, sowie über Geschichtliches, chemische Zusammensetzung, Vorkommen, Bedeutung und Funktion von alpha-1-Antitrypsin, dem wichtigsten humoralen Proteaseninhibitor des menschlichen Organismus berichtet.
- 2.) Im weiteren konnte bewiesen werden, daß es sich bei gelegentlich in mittels zweidimensionaler Immunelektrophorese mit monovalentem Anti-alpha-1-Antitrypsinserum untersuchten menschlichen Seren auftretenden zweiten, in Richtung Kathode gelegenen Gipfeln um einen Komplex aus Proteasen und alpha-1-Antitrypsin handelt.
- 3.) Es wurde ein Verfahren angegeben, das es ermöglicht, freies, inhibitorisch aktives alpha-1-Antitrypsin selektiv durch Adsorption an unlösliches Trypsin- oder Chymotrypsinharz aus Blutserum zu entfernen. Komplexgebundenes, inhibitorisch inaktives alpha-1-Antitrypsin verbleibt im Serum, ebenso wie eine geringe Menge des Inhibitors mit geringer Affinität zur Enzymcellulose, aber gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit wie normales freies alpha-1-Antitrypsin.

- 4.) Es wurde der Versuch unternommen, durch verschiedene Änderungen der Elektrophoresebedingungen Komplexgipfel deutlicher darzustellen, oder sich sonst nicht manifestierende Komplexverbindungen aufzufinden, was nach unserer Auffassung von späterer diagnostischer Bedeutung hätte sein können. Diese Versuche führten nicht zum gewünschten Ergebnis.
- 5.) Durch Homogenisieren von menschlichen Geweben wurde Gewebszerfall simuliert, um einen Anhaltspunkt zu gewinnen über die Menge der dabei freiwerdenden Proteasen und Proteaseninhibitoren.

Literaturverzeichnis

- (01) Bauer E., E.K.Frey,
H.Kraut,F.Schultz,E.Werle Naturwiss.17, 672 (1929)
- (02) Fermi C., L.Pernossi Zschr.Hyg.18, 83 (1894)
- (03) Camus L., E.Gley Compt.rend.Soc.de biol. 49,
825 (1897)
- (04) Landsteiner K. Centr.Bakteriol.Parasitenk.
27, 357 (1900)
- (05) Delezenne C., E.Pozersky Compt.rend.Soc.de biol. 55,
690 (1903)
- (06) Schwartz, D. Wien.Klin.Wschr.22,1151 (1909)
- (07) Bauer, J. Z.Immun.Forsch.Orig.5, 186
(1910)
- (08) Jobling J.W., W.Petersen J.Exp.Med.19, 459 (1914)
- (09) Meyer K. Berl.Klin.Wschr.46, 1890
(1909)
- (10) Cobliner S. Biochem.Z. 25, 494 (1910)
- (11) Trale F.H., E.Bach Proc.R.Soc.Med.13, pt.3,
Pathol.43 (1919/20)
- (12) Hedin S.G. J.Physiol.30, 195 (1903/04)
- (13) Wiens Münch.Med.Wschr.2637 (1907)
- (14) Meyer K. Folia serolog.VII 472 (1911)
- (15) Eisner G. Zschr.f.Immunitätsforsch.
Orig.I, 650 (1908/09)
- (16) Schmitz A. Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem.
255, 234 (1938)
- (17) de Smith L.S., J. Bacteriol.38, 221 (1939)
C.H. Lindsley
- (18) Jacobsson K. Scand.J.Clin.Lab.Invest.5, 97
(1953)
- (19) Jacobsson K. Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.
14, 83 (1955)
- (20) Schultze H.E., J.Göllner, Z.Naturforsch. 10b,463 (1955)
K.Heide, M.Schönenberger,
H.G. Schwick
- (21) Bundy H.F., J.W. Mehl J. Biol. Chem. 234, 1124 (1959)
- (22) Schultze H.E., K.Heide, Klin.Wschr.40 427 (1962)
H. Haupt
- (23) Heimburger N., H.Haupt, Proteinase Inhibitors of
Human Plasma, in Fritz,
H.G. Schwick Tschesche: Proceedings (1971)

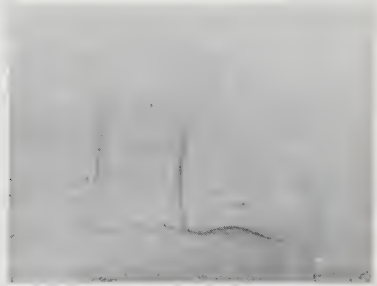
- (24) Schultze H.E., N.Heimburger, K.Heide, H.Haupt, K.Störiko, H.G.Schwick Proc.9th Congr.Muron.Soc. Haemat.,Lisbon 1963, S.Karger, Basel/New York 1315-1320 (1963)
- (25) Schumacher G.F.B. Contraception Vol.4, Nr.2, 67-78 (1971)
- (26) Hochstraßer K.,H.Haendle, R.Reichert, E.Werle Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem.352, 954-958 (1971)
- (27) Hochstraßer K.,R.Reichert, S.Schwarz, E.Werle Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem. 353, 221-226 (1972)
- (28) Rasche B., W.T. Ulmer Pneumonologie 144, 10-32(1971)
- (29) Karlson P. Kurzes Lehrbuch d.Biochemie, 6.Auflage, 55 (1967)
- (30) Janoff A. Ann.Rev.Med.Vol.23, 177-190 (1972)
- (31) Rimon A., J.Samash, B. Shapiro J.biol.Chem. 241, 5102-5107 (1966)
- (32) Schwick H.G., N.Heimburger, H.Haupt Zschr.Inn.Med.21, 1 (1966)
- (33) Haaf E. (Hrsg.) Lab.Synopsis, Behringwerke
- (34) Laurell C.B., S.Eriksson Clin.Chim.Acta 11, 395 (1965)
- (35) Talamo R.C., J.B.Blennerhassett, K.F.Austen New Engl. J. Med. 275, 1301-1304 (1966)
- (36) Rasche, Marcic, Ulmer Pneumonologie 146 (1971)
- (37) Reichert R., K.Hochstraßer, E.Werle Klin.Wschr.49, 1234 (1971)
- (38) Hochstraßer K.,R.Schuster, R.Reichert, N.Heimburger Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem. 353, 1120-1124 (1972)
- (39) Fritz H., G.Wunderer, K. Kummer, N.Heimburger, E. Werle Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem. 353, 906-910 (1972)
- (40) Liebermann I.,M.A.Gawad J.Lab.Clin.Med.77, 713-727 (1971)
- (41) Ohlsson K. Scand.J.Lab.Invest.28, 251-254 (1971)
- (42) Hochstraßer K., R.Reichert, M.Metzner, E.Werle Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.11, 104-107 (1971)
- (43) Kueppers F., A.G.Bearn Proc.Soc.Exp.Biol.Med.121, 1207 (1966)
- (44) Gaus, H., B.H.Tau Clin.Chim.Acta 17, 111-117 (1967)
- (45) Fritz H., N.Heimburger, M.Meier, U.Arnold, L.J.D. Zaneveld, G.F.B.Schumacher Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem.353, 1953-1956 (1972)
- (46) Baumstark Arch.Biochem.Biophys.118, 619 (1967)

- (47) Eisen, Bloch, Sakei J.Lab.Clin.Med.108, 53(1958)
- (48) Herman, Miescher Int.Arch. Allergy 27, 346
(1965)
- (49) Ohlsson K. Clin.Chim.Acta 32, 215-220
(1971)
- (50) Ohlsson K. Biochim.Biophys.Acta 236,
84-91 (1971)
- (51) Frimmer M. Int.Z.Klin.Pharm.Ther.Tox 5,
144-151 (1971)
- (52) Hunter C.G.,J.A.Pierce, J.Amer.Med.Assoc 205, 93-96
J.B.La Borde (1968)
- (53) Ohlsson K. Scand.J.Clin.Lab.Invest.28,
225-230 (1971)
- (54) Laurell C.B.,S.Erikson Scand.J.Clin.Lab.Invest.15,
529-538 (1963)
- (55) Erikson S. Acta Med.Scand. 175, 197-205
(1964)
- (56) Tarkoff M.P., F.Kueppers, Amer.J.Med.45, 220-228 (1968)
W.F.Müller
- (57) Kawalyskyn T., Chest 55, 285-289 (1969)
L.W. Sataline
- (58) Ganrot P.O.,C.B.Laurell, Scand.J.Clin.Lab.Invest.19,
S. Erikson 205-208 (1967)
- (59) Briscoe W.A.,F.Kueppers, Amer.Rev.Resp.Dis. 94,
L.A.Davis 529-539 (1966)
- (60) Talamo R.C.,K.F.Austen, Aspen Emphysema Conf.10,
J.D.Allen 491-495 (1967)
- (61) Welch M.H., M.H.Rienecke, Ann.Internat.Med.71,533-542
J.F.Hammerstein (1969)
- (62) Guenter C.A.,M.H.Welch, Arch.Intern.Med.122, 254-257
TR.Russel (1968)
- (63) Geokas, Rinderknecht, Lab.Invest.19, Nr.2, 235-239
Swanson, Haverback (1968)
- (64) Heilmeyer, L. Lehrbuch d.spez.pathol.Physiol.
Stuttgart, S.119 (1968)
- (65) Ascoli M., C. Bezzola Berl.Klin.Wschr.40, 391
(1903)
- (66) Ganrot P.O., B.Bjerre Acta Obst.Gynec.Scand.46, 1
(1967)
- (67) Müller H.E., I.Müller- Dtsch.med.Wschr. 93.Jg.
v.Voigt (Febr.1968)
- (68) Müller H.E., I.Müller- Dtsch.med.Wschr. 93.Jg.
v.Voigt (Jan.1968)

- (69) Petermann M. in "The Plasma Proteins" Vol.II, Hrsg.F.W.Putnam New York/London (1960)
- (70) Rapp W. Fortschr.Med.82, 932 (1964)
- (71) Ohlsson K. Scand.J.Clin.Lab.Invest.28, 13-19 (1971)
- (72) Ohlsson K. Scand.J.Clin.Lab.Invest.28, 5-11 (1971)
- (73) Laurell C.B. Scand.J.Clin.Lab.Invest.17, 271-274 (1965)
- (74) Fritz H., J.Müller, M.Wiedemann, E.Werle Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem.348, 405-418 (1967)
- (75) Fritz H., H.Schult, M.Hutzel, M.Wiedemann, E.Werle Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol. Chem.348, 308-312 (1967)
- (76) Lieberman J., C.Mittmann Amer.Thoracic.Soc.Meeting, Kansas City, Mey 22 (1972)
- (77) Janoff, Zeligs Science 161, 702 (1968)
- (78) Janoff, Lab.Invest.22, 228 (1970)
- (79) Ohlsson K. Scand.J.Clin.Lab.Invest.28, 219-223 (1971)
- (80) Ohlsson K., P.O.Ganrot, C.B.Laurell Acta chir.Scand.137, 113 (1971)
- (81) Ohlsson K. Scand.J.Gastroent.6, 645-652 (1971)
- (82) Ohlsson K. Acta Physiol.Scand.81, 269-272 (1971)
- (83) Enzyme Nomenclature, Recommendations (1964) of the International Union of Biochem.Elsevier Publ.Comp., Amsterdam (1965)
- (84) Fritz H., J.Trautschold, E.Werle in "Methoden der enzymat. Analyse" Hrsg.Bergmeyer H.U., Auflg.2, Bd.1, S.1021-1037, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)
- (85) Laurell C.B. Anal.Biochem.10, 358-361 (1965)
- (86) Laurell C.B. Anal.Biochem.15, 45 (1966)
- (87) Fagerholm M.K., M.Braend Science 149, 986 (1965)
- (88) Fagerholm M.K., C.B.Laurell Clin.Chim.Acta 16, 199-203 (1967)
- (89) Stephan N., U.Frahm Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.9, 224-228 (1971)
- (90) Hochstraßer, K., K.Hochgesand, R.Schuster, K.E.Baader, F.Pecher, H.Fritz, N.Heimbürger Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.11, 286-290 (1973)



Abb.1



1

Abb.2

2

Abb.1: Immunelektrophorese von Humanserum mit natürlichem Doppelgipfel 8 ul Serumverdünnung, 70 ul Anti-alpha-1-Antitrypsinserum im Präzipitationsgel

Abb.2: Bedingungen wie bei Abb.1; 1 = freies alpha-1-Antitrypsin, 2 = komplexiertes alpha-1-Antitrypsin



Abb.3

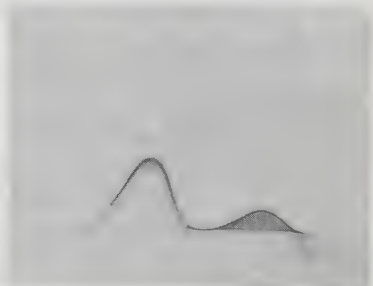


Abb.4

Abb.3: Immunelektrophorese von 4 ul Serumverdünnung; 100 ul Anti-alpha-1-Antitrypsinserum im Präzipitationsgel

Abb.4: Serum von Abb.3 bis zur 50%igen Aufhebung der Hemmkapazität nach Photometertest mit Trypsinlösung versetzt

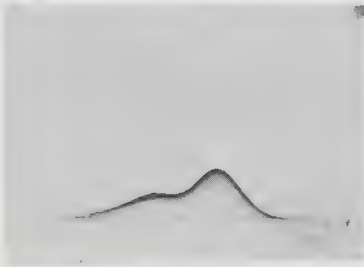


Abb.5



Abb.6

Abb.5: Serum von Abb.3; Trypsin etwas im Überschuß zur vollständigen Aufhebung der Hemmwirkung nach Photometertest zugegeben

Abb.6: Serum mit kleinem natürlichen Doppelgipfel, 4 ul Serumverdünnung, 100 ul Anti-alpha₁-Anti-trypsinserum im Präzipitationsgel



Abb.7



Abb.8

Abb.7: Serum wie bei Abb.6; 50%ige Trypsinzugabe

Abb.8: Serum wie bei Abb.6; 105%ige Trypsinzugabe

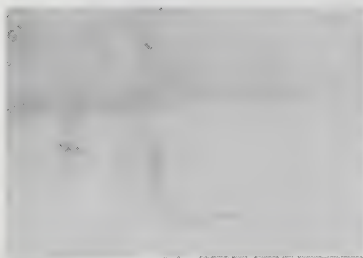


Abb.9



Abb.10

Abb.9: Immunelectrophorese von Humanserum mit kleinem natürlichem Komplex; 4 ul Serum, 100 ul Anti-alpha-1-Antitrypsinserum

Abb.10: Serum wie bei Abb.9, harzbehandelt

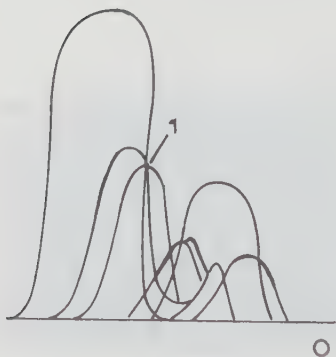


Abb.11



Abb.12

Abb.11: Simultanelektrophorese von Humanserum nach Modifizierung mit β -Propiolacton, 2 ul Serum, 240 ul Antihumanserum im Präzipitationsgel, 1 = alpha-1-Antitrypsin

Abb.12: Simultanelektrophorese von Humanserum nach Behandlung mit Trypsinharz und Modifizierung mit β -Propiolacton, sonst wie Abb.11, Originalfotos siehe (90)



Abb.13



Abb.14

Abb.13: Elektrophorese von zu 50% komplexiertem Human-serum 7 ul Serumverdünnung, 100 ul Anti-alpha-1-Antitrypsinserum

Abb.14: Elektrophorese von zu 50% komplexiertem Human-serum, das mit 0,65 g Harz behandelt wurde (7/100)



Abb.15

Serum wie bei Abb.13 und 14, mit 1,0 g Trypsinharz behandelt, 7 ul Serumverdünnung, 100 ul Anti-alpha-1-Antitrypsinserum im Präzipitationsgel



Abb.16



Abb.17

Abb.16: Serum mit Komplex, harzbehandelt (8/70)

Abb.17: Serum wie bei Abb.16, eingeeengt (16/70)



SEHRN O. BRUNN

Abb.18

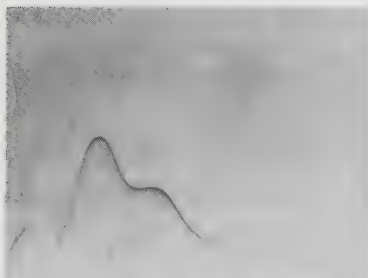


LEBER + S. BRUNN

Abb.19

Abb.18: Immunelektrophorese von Humanserum (4/100)

Abb.19: Immunelektrophorese von homogenisiertem Lebergewebe (Verhältnis 600 mg Gewebe/1 ml Serum von Abb.18)(4/100)



MILZ + S. BRUNN

Abb.20



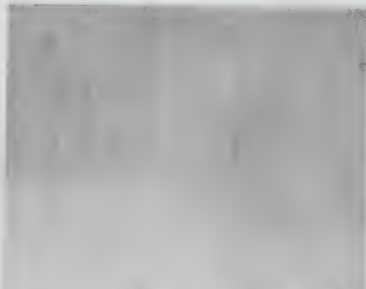
NIERE + S. BRUNN

Abb.21

Abb.20: Milzgewebe

Abb.21: Nierengewebe

Bedingungen wie oben



RECTUM + S. BRUNN

Abb.22

Abb.22: Rectumgewebe, Bedingungen wie oben

Danksagung

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Priv.Doiz. Dr. K. Hochstraßer für die Überlassung des Themas und das große, stets freundliche Entgegenkommen bei der Fertigstellung desselben meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Dr. K. Hochgesand für die vielen Anregungen, die er zu der Arbeit gab, und Herrn Dr. H. Feuth, der die Bereitstellung der Gewebe ermöglichte.

Lebenslauf

Am 26. April 1948 wurde ich als zweiter Sohn meiner Eltern, Hans und Maria-Gabriele Baader, geb. Freiin von Preuschen v.u.z. Liebenstein, in Augsburg geboren. Ich besuchte die Volksschule in Batzenhofen (1954-58) und Augsburg (1958-59) und trat im Herbst 1959 in das Realgymnasium Augsburg (jetzt Peutinger Gymnasium) über. Im Sommer 1968 bestand ich dort das Abitur. Ab Herbst 1968 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München, nach einem Semester Naturwissenschaften, Zahnmedizin. Nach bestandenem Vorphysikum (1970) und Physikum (1971) beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen 1974. Zur Zeit der klinischen Semester, im Sommer 1973, begann ich den experimentellen Teil der Dissertation im Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München.

Introduction

In the early 1950s, the first of the three main areas of research in the field of human development was the study of the physical growth and development of the individual. This was followed by the study of the psychological development of the individual, and finally the study of the social development of the individual. The study of the physical development of the individual was the most extensive and the most detailed. It was the study of the physical development of the individual that provided the most comprehensive and the most detailed information about the individual. The study of the psychological development of the individual was the most extensive and the most detailed. It was the study of the psychological development of the individual that provided the most comprehensive and the most detailed information about the individual. The study of the social development of the individual was the most extensive and the most detailed. It was the study of the social development of the individual that provided the most comprehensive and the most detailed information about the individual.

